

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ⑫ 公開特許公報(A)

平1-265968

⑤Int.Cl.<sup>4</sup>

A 61 L 27/00

識別記号

庁内整理番号

G-6971-4C

④公開 平成1年(1989)10月24日

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全8頁)

⑥発明の名称 骨誘導性修復用の注入可能な組成物

②特 願 昭63-319326

②出 願 昭63(1988)12月16日

優先権主張 ③1987年12月16日③米国(US)③133,532

⑦発 明 者 ランガ ナザン アメリカ合衆国 カリフォルニア 94560 ニューアー  
ク, ロバートソン アベニュー 6104⑦発 明 者 アンドレア トンプソ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94043 マウンテン  
ン ビュー ナンバー1, イージー ストリート 221⑦発 明 者 サイド セイデイン アメリカ合衆国 カリフォルニア 94087 サニーベ  
イル, ケシヤイア ウエイ 645⑦出 願 人 コラーゲン コーポレ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303 パロ アル  
ーション ト, フェイバー ブレイス 2500

⑦代 理 人 弁理士 山本 秀策

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

骨誘導性修復用の注入可能な組成物

## 2. 特許請求の範囲

1. 原繊維アテロペプチドコラーゲンと、少なくとも部分的に精製された骨形成因子との水性懸濁液を含有する、注入可能な骨成長誘導性組成物。

2. 前記コラーゲンの濃度が約5～約65mg/mlの範囲である、請求項1に記載の組成物。

3. 前記原繊維アテロペプチドコラーゲンと、少なくとも部分的に精製された前記骨形成因子とが、共沈物の形態である、請求項1に記載の組成物。

4. 前記共沈物の骨形成因子に対するコラーゲンの重量比が約5:1～300:1の範囲である、請求項2に記載の組成物。

5. 前記骨形成因子が、脱無機質化された酸性的骨抽出物から共沈する、請求項4に記載の組成物。

6. 請求項4に記載の組成物の製造方法であっ

て、

(a)アテロペプチドコラーゲンと骨形成因子との酸性水溶液を調製すること；

(b)該溶液のpHを高めることによって、該アテロペプチドコラーゲンと該骨形成因子とを共沈させること；及び、

(c)必要に応じて、得られた懸濁液中の該共沈物の濃度を、アテロペプチドコラーゲンに基づいて約5～約65mg/mlに調節すること、

を包含する、製造方法。

7. 前記骨形成因子が、脱無機質化された骨抽出物として存在する、請求項6に記載の製造方法。

8. 前記溶液中の脱無機質化された骨抽出物に対するアテロペプチドコラーゲンの重量比が約5:1～300:1である、請求項7に記載の製造方法。

9. 前記溶液のpHが約6.5～約8.5に高められ、請求項6に記載の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、タンパク化学および骨形成術の分野

に属するもので、特に、骨の再生に有効な、原繊維コラーゲンと骨形成因子とを含有する注入可能な調製物に関する。

(従来の技術)

歴史的に見て、骨の修復のための方法は進歩しており、現在では、失われた骨材料にとって代わると共に、適切な修復を行う骨細胞の能力を助ける、様々な組成物の供給が可能となっている。これまでの研究者は、骨始原細胞を骨組織へ成熟させるのは骨組織内に存在するタンパク因子であることを認識していた。これらの因子は、これまですべてが特定されているわけではなく、また特徴も完全に明らかになっているわけではない。しかし、これらの因子が存在するか否かに基づき、これらの調製物自体がこれらの因子を供給するか否かによって、調製物を「伝導性」調製物と「誘導性」調製物とに分類することが可能となっている。

「伝導性」調製物には、骨形成因子 (OF) は含まれていない。これらは、新たな成長のマトリックスを提供することによって、いわば「受動的」

な方法で骨の修復を行う。これら組成物には多くの種類がある。本発明の調製物に特に関連するものは、主としてある種のコラーゲン、すなわち骨の有機構造材料から成る骨修復組成物である。コラーゲンマトリックスは、欠損部への新しい骨の内方向成長のための所望の構造を提供することができると考えられる。実際に、このマトリックスは、成熟した骨細胞と接触させると、その中に入り込み、無機質網状組織を作って骨の成長を完成させることができる。つまり、このマトリックスと接触している生きた組織は、OFの必要条件を全て提供する。実際に、これを目的として、コラーゲン自体、またはヒドロキシアパタイトを混合したコラーゲンを使用した例が、ここ数年、方々で報告されている。

このように単に受動的に新しい骨組織の侵入成長と、その後の無機質化とをもたらすだけでなく、骨原細胞が骨細胞へ変化するよう能動的に誘導して骨の修復を行うことができる。すなわち「誘導性」修復作用を持った骨修復マトリックスを作り

出すことが望ましいのは、いうまでもないであろう。インビボでの骨形成プロセスは複雑であり、部分的にしか解明されていない。しかし、これには、軟骨細胞または軟骨を作ることのできる細胞の中間形成が関係しており、これら軟骨細胞が、無機質化をもたらすことのできる細胞に置き換わると考えられる。最近では、このような分化をもたらす材料の研究が行われている。

骨自体に、その形成プロセスに関与する1つ以上の因子が含まれていることは確かである。そこでいかなる因子がこの様な作用をもたらすのかを明らかにすべく、努力が重ねられている。Uristの米国特許第4,294,753号および第4,455,256号の開示によると、尿素またはグアニジン塩酸塩を用いて脱無機質化された骨から「骨形態形成タンパク」(BMP)を抽出し、再沈澱させた。Uristは、その後、pH4.8でカルボキシルメチルセルローズ樹脂(CMC)に吸収されない、この粗製タンパク混合物をイオン交換法で精製することによって、活性が生じたと報告している(Urist, M.R.,

Clin Orthop Rel Res (1982) 162:219)。Uristの報告(Science (1983) 220: 680-685およびProc Natl Acad Science (USA) (1984) 81:371-375)には、17,500ダルトンおよび18,500ダルトンの分子量を有するBMPが記載されている。Uristの極く最近の欧州特許出願公開第0212474号によれば、BMPの制限タンパク分解によって、4,000から7,000ダルトンのBMP画分が得られる。

SeydinおよびThomasの米国特許第4,434,094号には、カオトロピック試薬を用いた抽出、アニオンおよびカチオン交換カラムでの分画、およびpH4.8でCMCに吸着される画分からの活性の回復による、骨の生成を促す骨タンパクの部分的精製について報告している。この新しいタンパク画分は「骨形成因子」(OF)と呼ばれ、分子量が約30,000ダルトン以下という特徴を有している。

共有される米国特許第4,774,322号には、米国特許第4,434,094号に開示された精製法と部分的に類似した精製法を用いて均質に精製された2種類のタンパクが記載されている。これら2種類の

タンパクは、約150~200 mMのNaCl濃度勾配でCMCから溶離された。これら2種類のタンパクは元来、軟骨誘導性因子(CIF) AおよびCIF Bと呼ばれていた。その後CIF Aは、以前に確認されたタンパクで、形質転換成長因子ベータ(TGF- $\beta$ )と呼ばれているものと同一であることが判明した。またCIF Bは、TGF- $\beta$ の新種であることが判明し、現在ではTGF- $\beta$ 2として知られている。これらの両方とも、それら自体は、インビボでの骨形成活性を有していない。

共有される米国特許第4,627,982号は、TGF- $\beta$ およびTGF- $\beta$ 2の主要部分が溶離されるNaCl濃度勾配よりも低いNaCl濃度勾配部分(すなわち約150 mM NaClより低い濃度勾配部分)に溶離される米国特許第4,434,094号のCMC結合面分内に存在する、部分的に精製された骨誘導性因子に関するものである。

これら特定の誘導性修復因子が、未精製の、あるいは純粋な形で入手し得るようになった結果、骨欠損部へ移植するための調製物を処方する試み

が行われることとなった。米国特許第4,440,750号には、再構成されたコラーゲン繊維と、脱無機質化された骨粉末とを含む骨形成組成物が開示されている。この特許は、該混合物を注入可能な形で処方する方法を示唆している。しかし、該混合物は、骨粉末の粒子が針に詰まることから、実用的な濃度の該混合物を注入器によって供給することは、不可能でないにしても、実用的ではない。米国特許第4,394,370号(Jefferies)には、性質が特定されていないコラーゲンと、脱無機質化された骨粒子または溶解した骨形態形成タンパク(おそらくUristの骨形態形成タンパク)とを含有する組成物が開示されている。このJefferiesの材料は、骨欠損部への移植に適したスポンジだと説明されている。この移植物の誘導性作用を評価する方法は示されていない。米国特許第4,563,350号には、CMCからの吸着と脱離、またはpH7でアニオン交換樹脂による抽出物の低分子量画分の処理と非結合画分の回収によって部分的に精製された移植組成物について記載されている。

これらの因子は、少なくとも5重量%の非繊維形態のコラーゲンを含有するコラーゲン担体と共に投与される。これらの処方物は、固体骨移植物として構成された。

米国特許第4,687,763号には、脱無機質化された骨抽出物を、柔軟なコラーゲン支持体上に沈殿させることによって調製される、骨の成長を促す固体移植物について記載されている。この調製は、抽出剤溶媒用の溶媒を抽出物溶液へ添加することによって行われる。

上述の組成物はどれも、実用的な注入可能誘導性調製物ではない。このような注入可能調製物の利点は、注入不能誘導性調製物を用いる場合に共通して必要となる外科手術を避けることができることにある。本発明は、原繊維コラーゲンと、少なくとも部分的に精製されたOFとを含有する注入可能な調製物に関するものである。

(発明の要旨)

本発明は、人間および他の哺乳類における骨の修復に使用され得る、新規な注入可能調製物を目

的としている。この調製物は、その最も単純な形では、原繊維状アテロペプチドコラーゲンと、少なくとも部分的に精製された骨形成因子との水性懸濁液を含有している。この調製物には、骨成長促進剤(例えば、TGF- $\beta$ )や骨形成を促進し得る走化性因子などの他の活性成分を添加することができる。これら添加された物質は、組成物の注入可能性を損なわないものでなければならない。

生きている哺乳類個体の体内における所定部位の骨成長を、該部位に該調製物を注入して誘導する方法も、本発明の一部を成している。

また、~~調製物の~~好ましい実施態様の調製物を製造する方法も、本発明のさらに他の側面である。該製法は、以下の工程を包含する：

(a)アテロペプチドコラーゲンと骨形成因子との酸性水溶液を調製すること；

(b)該溶液のpHを高めることによって、アテロペプチドコラーゲンと骨形成因子とを共沈させること；及び、

(c)必要に応じて、得られた懸濁液中の共沈物の

湿度を、アテロペプチドコラーゲンに基づいて約5～約65mg/mlに調節すること。

(発明の構成)

#### A. 溶液のコラーゲン成分の調製

本発明の注入可能組成物を製造するのに適したコラーゲンは、アテロペプチドコラーゲンの酸性水溶液である。この溶液の調製は当該分野で周知であり、VITROGEN 100コラーゲン溶液(CIS) (Collagen Corporation, Palo Alto, CA)などの調製物が市販されている。本発明の注入可能調製物の製造に適した他のコラーゲンとして、再構成された原繊維コラーゲンがあり、これは出発物質としてCISを使用するか、またはZyderm®コラーゲン移植体(ZCI) (Collagen Corporation, Palo Alto, CA)といった市販の調製物を用いて調製することができる。しかし、コラーゲン成分の調製法は特に限定されるものではなく、適切な材料を得るための方法の概要を以下に示す。得られたコラーゲンの精製度が高く、免疫原性の少なくとも部分的要因であると考えられるアテロペプチドが

含まれていない限り、任意の哺乳類を起源とするコラーゲン成分を用いることができる。可溶化することにより、免疫原性を低下させる精製された形態のコラーゲンが作り出される。

適切な製造方法においては、哺乳類の革調製物、好ましくはウシの革を、弱酸の中に浸け、次いで毛、表皮、および脂肪を掻き落とすことによって柔らかくする。このようにして毛抜きした革を再び弱酸の中に浸け、すりつぶすか刻むかして、細分化された調製物を作り、これを水性媒体中に分散させ、さらにコラーゲナーゼ以外のタンパク分解酵素、好ましくは低pHでも活性な酵素によって分解させることによって、非変性条件下で可溶化させる。酸溶液としては、例えばHClまたはカルボン酸(例えば、酢酸、マロン酸、乳酸など)の希釈された酸溶液を低温にて、使用酵素に応じて通常pH1.5～5で使用する。好ましい方法は、細分化された組織を、HCl中に、20℃で約pH2にて、1～5g/lの湿度に分散させることである。組織を分散させた後、酵素を添加し、テロペプチド、お

よび組織の他の可溶性成分を酵素によって分解するためにこの混合物をインキュベートする。コラーゲンの三重螺旋部分を攻撃しない、テロペプチドの分解に適した酵素としては、ペプシン、ババイン、及びトリプシン(好ましくは、トリプシン)が挙げられ、これらの酵素濃度は、組織のコラーゲン含量に基づいて、0.1～10重量%の範囲である。インキュベーション期間は、約2日から2週間程度であり、可溶化の過程は溶液の粘度を測定することにより監視することができる。この粘度が実質的に定常レベルに達すれば、可溶化は完了しているので、酵素を不活性化して取り除く。

酵素を変性させた後、変性した酵素と、組織の分解した部分とを、様々な方法(例えば、透析、沈降、または濾過)、あるいはこれら方法の組み合わせによって取り除くように溶液を処理する。コラーゲンを含む可溶性成分は、沈降または濾過された固体から分離して濃縮し、必要に応じてイオン交換クロマトグラフィーで分画してから、さらに濃縮して、実質的に純粋なアテロペプチドコ

ラーゲン溶液を調製する。溶液中のコラーゲン(CIS)の典型的な湿度レベルは、3～25mg/mlである。このCISは、低温、好ましくは約10～25℃で、好ましくは生理学的イオン強度に対して低張条件下で、溶液を中和することにより、原繊維状に再構成することができる。中和溶液は、直接、または好ましくは可溶化されたコラーゲンを透析することにより添加することができる。イオン強度は約0.03～0.1Mを使用する。pHは、適当な塩基または緩衝液(例えば、リン酸二ナトリウムまたは水酸化ナトリウム)を加えることにより、溶液中のコラーゲンが再凝集して原繊維となるレベルまで高めることができる。これらの条件下で原繊維は、pHが約5～10の範囲にあるときに形成されるが、最終pHは、5～8の範囲であることが好ましい。原繊維形成の持続時間は、通常、約30分から18時間の範囲である。

#### B. 溶液中の骨形成因子成分の調製

骨形成因子または精製された形態のこの因子を含む部分的に純粋な脱無機質化された骨抽出物を

使用することができる。例えば、米国特許第4,627,982号に記載された部分的に精製された因子を使用することができる。このことに関し、「少なくとも部分的に純粋な」という用語は、以下に述べるような非繊維状タンパクの脱無機質化骨抽出物、好ましくは少なくとも米国特許第4,627,982号に記載されたレベルまで精製されたものを意味する。部分的に精製された因子は、0.01~0.1 Mのリン酸ナトリウムを添加して、pH 6~8のリン酸塩緩衝液中で沈殿させることにより、さらに精製することができる。この沈殿物は次いで、非イオン性カオトロピック試薬に再溶解され、ハイドロキシアパタイトカラムを用いてHPLCによりクロマトグラフィー分析される。いずれにせよ、この因子を骨から得る方法は、以下の通りである。

まず骨を、機械的方法または摩擦により汚れを取り除き、粉碎し、さらに例えば希釈された酸水溶液を用いて、好ましくは低温で洗い、そして親油性の溶媒（例えば、エーテルまたはエチルアセテート）で抽出し脱脂する。次いで、この骨を、通

常、より強い酸で抽出して、様々な形態のリン酸カルシウムを除去することにより脱無機質化する。これらの技術は当該分野で周知であり、例えば米国特許第4,434,094号に開示されている。得られた調製物、すなわち脱無機質化された骨が、本発明の骨形成タンパク調製物の出発物質となる。

最初の抽出は、非繊維状（例えば、非コラーゲン）タンパクを脱無機質化された骨から除去することが目的である。これは、グアニジン塩酸塩（少なくとも約4モル）、尿素（8モル）と塩類、またはドデシル硫酸ナトリウム（少なくとも約1容量%）などのカオトロピック試薬、あるいは当該分野で周知の他のカオトロピック試薬（Termineら、*J Biol Chem*(1980)255:9760-0772；そしてSajeraおよびHascall、*J Biol Chem*(1969)244:77-87 および2384-2396）を用いて行うことができる。抽出は、好ましくは低温にてタンパク分解酵素阻害剤の存在下で行うことにより、抽出されたタンパクが分解されたり変性したりする可能性を低減させる。使用し得るタンパク分解酵素阻害剤の例と

しては、フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)、〔アジ化ナトリウム〕、N-エチルマレイミド(NEM)、ベンズアミジン、および6-アミノヘキサン酸が挙げられる。媒体のpHは、選択された抽出剤に応じて定められる。抽出に要する時間は、一般に、約4時間から1日程度である。

(以下余白)

抽出後、抽出剤は、必要なら先に限外濾過により濃縮を行ってから水に対して透析を行うなどの適当な手段により排除することができる。塩類もまた、制御された電気泳動または分子ふるい、あるいは当該分野で周知の他の手段によって除去することができる。タンパクの変性を最小限に抑えるために、この工程の間は低温を維持することが好ましい。また、抽出剤カオトロピック試薬は必ずしも除去する必要はなく、溶液を、例えば限外濾過によって濃縮するだけでよい。

カオトロピック試薬に溶解または再溶解した抽出物を、ゲル濾過に供し、分子量が約20,000から35,000ダルトンの範囲の画分を得る。ゲルによるサイズ分類は、標準的な方法で行われる。これは、Sephacryl S-200カラムを用いて常温（10℃~25℃）で行うことが好ましい。

次いで、サイズ分類された画分は、非イオン性カオトロピック試薬（例えば、6 Mの尿素）の存在下で、約pH4.5~5.2（好ましくは約pH4.8）のCMCを用いて、イオン交換クロマトグラフィーに供さ

れる。他のカチオン交換体（ポリアクリルアミドおよび架橋デキストランから誘導されたものを含む）を用いることもできるが、好ましいのはセルロースカチオン交換体である。もちろん、どのイオン交換法においても、溶液は、カラムにかける前に競合イオンを含んでいてはならない。上記因子は、カラムに吸着させ、そして約10～約150 mMの範囲で塩の濃度勾配を増大させて溶離される。この画分は、便宜上、「CMB-1」と称されている。CMB-1は、透析により、または $C_{18}$ 逆相カラムを用いて脱塩される。

### C. 本発明の組成物の調製

本発明の組成物は、CISをOFと共沈させることにより、または再構成された原繊維コラーゲンをOFと単に混合することにより、調製することができる。

#### 1. 共沈

原繊維コラーゲンとOFとを混合する好ましい方法は、共沈による方法である。あるいは、機械的ミキサーまたはホモジナイザを用いて2つの成分

注入による投与を可能とするためには、再構成された原繊維コラーゲンの濃度は、5～65mg/ml、好ましくは10～20mg/mlであり得る。コラーゲン濃度がより高い再構成コラーゲン懸濁液は、OF溶液と混合し、コラーゲン濃度を低くする場合には、使用することができる。混合物における、部分的に純粋なOFに対するコラーゲンの重量比は、上記と同様である。

上に示した通り、この調製物には不活性物質または生理活性物質をさらに添加することができる。これらの添加物質は、組成物の注入可能性を損なわないものでなければならない。

#### E. 投与形態

本発明の組成物は、注入可能なものとして調製される。これら組成物は、医師に周知の従来の注入法によって欠損部へ投与される。この点に関し、これら組成物は、適切な無菌投与用注入器に装填すると便利である。これらの組成物は、使用前は、低温（例えば、約4℃）で保管し、欠損部の大きさと、欠損部治療に際して意図された組成物の役

を混合する方法があるが、それほど望ましくない。好ましい共沈法とは、以下のような方法である。まずOFを、必要に応じて、酸（例えば、0.01N HCl、pH2.0）に、約3μg/ml～3mg/ml範囲の濃度で、可溶化する。CIF/OF混合物は、溶液のpHを、約6.5～8.5、好ましくは約7～7.5まで高めることによって共沈させる。これは、塩基、好ましくは0.2Mリン酸緩衝液（pH11.2）を添加することによって行う。得られた沈殿物は、遠心分離器で分離し、注入可能な媒体中に所望の濃度で再懸濁させる。懸濁液中の共沈物の濃度は、通常、5～65mg/ml、好ましくは10～25mg/mlの範囲である。少なくとも部分的に精製されたOFに対するコラーゲンの重量比は、通常、5:1から300:1である。

#### 2. 混合

注入可能なコラーゲンとOFとの混合物の適当な調製方法は、一方の濃度が他方の濃度の許容範囲を左右するため、様々である。従って、最終組成物に必要なパラメータを考慮することが好ましい。

割とに応じた量を投与すべきである。

#### （実施例）

以下の実施例は、本発明をさらに説明をするものであって、本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

部分的に精製されたCMB-1画分は、米国特許第4,563,350号に従ってウシの骨粉末から調製した。簡潔に述べると、ウシの中足骨を、0.5N HCl中で脱無機質化し、4Mのグアニジン塩酸塩（GU.HCl）で解離的に抽出処理した。GU.HCl抽出物は、濃縮後、ゲル濾過カラム（S-200）にかけて、低分子量タンパク（F35 K ダルトン）を得た。この低分子量タンパクは、さらに濃縮し、GH-25カラムで脱塩し、そしてカチオン交換カラム（CM-52）にかけて、CMB-1画分を得た。CMB-1タンパクは、逆相HPLCカラム（C18）にかけて最終的に脱塩し、直接凍結乾燥した。

CMB-1タンパクは、以下のようにしてコラーゲンと共沈させた。すべての工程は、層流フード内で行った。凍結乾燥されたCMB-1を、0.01N HCl（

pH2.0) に、約2.5 mg/ml のタンパク濃度で溶解した。この溶液を0.22mm フィルターで無菌濾過し、VITROGEN®100 CIS (3 mg/ml) と混合した。この混合物は、約5分間攪拌して完全に混合させた。CMB-1 タンパクとコラーゲンとの共沈は、溶液9部に対して、1部の0.2 Mリン酸緩衝液 (pH11.2) を添加することにより行った。この混合物を約5分間攪拌し、そのまま約18時間、フードに入れたまま放置した。得られた沈殿物、すなわちCMB-1 タンパクと原繊維コラーゲン(FC)との混合物を、12,000RPM で20分間遠心分離し、上清から分離した。この上清は、タンパク測定のため保存した。沈殿物を回収し、その湿重量を測定した。これまでの測定結果から、コラーゲンタンパク全体の約85%が、CIS からFCの形で沈殿すると予想される。FC濃度は、上記の上清と、1.3 M NaCl, 0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) とを沈殿物希釈の媒体として用いて、0.13M NaCl, 0.02M リン酸ナトリウム緩衝液中で15mg/ml となるように調節した。このFC/CMB-1複合体は、注入器間で均

組織学的に見て、共沈物を含有する処方物は、移植後7日間で軟骨の形成を大幅に誘導していることが示された。また、この時点で、移植物の周辺に早期骨形成の徴候が見られた。この観察結果を裏付けるように、これら移植物におけるアルカリホスファターゼ (AP) の活性が高まっている (移植物1g 当たり約35ユニットのAP)。FCだけのサンプルを注射した対照試験グループでは、生化学的活性は認められなかった。注射後14日では、FC/CMB-1移植物のすべてにおいて、骨の形成の増大が見られ、骨髄をほぼ識別することができた。軟骨の活性化は、認められないか、または極めて低いレベルで移植物の中心部で確認できた。組織学的に見て、移植物による炎症の徴候は見られなかった。これは、該移植物が宿主組織と適合していることを示している。

#### 実施例 2

共沈物は、CMB-1 タンパクの代わりに、より高度に精製した (上記のように、ConAアフィニティークロマトグラフィーにより精製した) 骨形成タ

質化することにより、完全に混合させた。均質化したサンプルは、次いで、1ccの注入器に装填し、使用時まで冷凍状態 (4℃) で保存した。

FC/CMB-1共沈物が哺乳類の軟骨組織形成を誘導する能力は、以下のようにして確認した。Sprague-Dawleyラット (生後34~40日の雄) の腹胸部の片側に、0.2 ccのFC/CMB-1混合物を皮下注射した。CMB-1 を含まないFCだけのサンプルも、陰性の対照として注射した。移植物を7日後および14日後に取り出し、軟骨および骨の形成状態を生化学的および組織学的に調べた。

以下の表1は組織学的検査の結果をまとめたものである。

グループ	表1			
	移植後7日		移植後14日	
	軟骨	骨	軟骨	骨
FC/OF	4 +	2 +	2 +	4 +
FC対照	0	0	0	0

ンパクを用いたこと以外は、実施例1と同様にして調製し、試験した。

得られた結果は、実施例1で得られた結果と同様であり、共沈物を含んだ移植物には極めて高い骨誘導性活性が認められた。

#### 実施例 3

65mg/ml のZydermコラーゲン移植物(ZCI) 材料を、0.13MのNaClを含む20mMのリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて、濃度が35mg/ml となるまで希釈した。希釈したコラーゲンは、実施例1のCMB-1 タンパクと十分に混合し、1.2 mg/ml のCMB-1 タンパクに対し、コラーゲンの最終濃度を30mg/ml とした。この組成物のOFの割合は、約3.8%である。次いでこの混合物を1cc注入器に装填し、注入時まで4℃で保存した。

哺乳類の軟骨組織形成を誘導するZCI/CMB-1 混合物の能力は、以下のようにして確認された。4匹の若い雄のSprague-Dawleyラットの腹胸部の片側に、0.5 ccのZCI/CMB-1 を皮下注射した。米国特許第4,563,350号に記載されている、再構成



され脱無機質化された骨 (R-DBP) , および ZCI だけ用いた。ZCI の対照注射は 0.5 cc の ZCI を用い行い、対照サンプル R-DBP (40mg) は外科手術移植した。

移植物は、14日後と28日後に取り出して、軟骨と骨形成状態を生化学的および組織学的に調べた。組織学的判定は、標準的な手順により固定、切片化し、そして染色した後に行った。生化学的判定は、軟骨のプロテオグリカン含有量およびアルカリホスファターゼの比活性を分析することにより行った。

組織学的判定の基準となったのは、軟骨誘導性、骨形成、導管化、および繊維芽細胞の侵入である。これらの基準から、コラーゲンの対照注射は、28日後にわずかの導管化および繊維芽細胞の侵入が認められたこと以外は活性が認められず、14日後はこれらもみとめられなかった。ZCI/CMB-1 組成物および R-DBP 組成物は両方とも、これら4つの基準すべてについて活性を示したが、ただし、R-DBP 組成物の方が ZCI/CMB-1 組成物よりも、わ

ずかながら均等かつ大きな活性を示した。

14日後に分析したプロテオグリカンの活性は、ZCIのみを用いた場合は全く認められず、ZCI/CMB-1を用いた場合は湿潤組織 1 g 当たり 550 mg の C-PG、R-DBP を用いた場合は湿潤組織 1 g 当たり 1300 mg の C-PG であった。

アルカリホスファターゼ活性は、14日後と28日後に分析したが、この場合も ZCI だけを注射した動物から取り出した移植物には、アルカリホスファターゼ活性は実質的に認められなかったのに対し、ZCI/CMB-1 を注射したラットから取り出した移植物には、湿潤組織 1 g 当たり、14日後で 8.5 U、28日後で 14.5 U の AP が認められた。R-DBP を注射したラットから取り出した移植物のアルカリホスファターゼ活性は同じく、14日後で 12 U/g、28日後で 20 U/g であった。

以上のことから、注入可能な混合 ZCI/CMB-1 組成物は、R-DBP 調製物と同等の骨形成促進活性を有し得ると結論づけることができる。

タンパク化学および骨形成術の分野における当

業者に明白な本発明実施の上記様式の変更も特許請求の範囲に包含される。

#### (発明の要約)

原繊維アテロペプチドコラーゲンと、骨形成因子との水性懸濁液は、骨欠損部を修復するために有効な注入可能調製物である。

以 上

代理人 弁理士 山本秀策